

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年8月2日 (02.08.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/54705 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 31/765, A61P 35/04, A23L 1/30

Masahiro) [JP/JP]; 〒620-0055 京都府福知山市篠尾新町3-100 エル・アルカサル703 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/00482

(22) 国際出願日: 2001年1月25日 (25.01.2001)

(74) 代理人: 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.); 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-16525 2000年1月26日 (26.01.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 天藤製菓株式会社 (AMATO PHARMACEUTICAL PRODUCTS, LTD.) [JP/JP]; 〒620-0932 京都府福知山市篠尾町995 Kyoto (JP). 東海教育産業株式会社 (TOKAI EDUCATION INSTRUMENTS CO., LTD) [JP/JP]; 〒259-1143 神奈川県伊勢原市下粕屋164 Kanagawa (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

添付公開書類:

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 村山千恵子 (MURAYAMA, Chieko) [JP/JP]; 〒243-0431 神奈川県海老名市上今泉5-38-1 Kanagawa (JP). 長戸康和 (NAGATO, Yasukazu) [JP/JP]; 〒243-0122 神奈川県厚木市森の里2-20-12 Kanagawa (JP). 村上正裕 (MURAKAMI,

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: CANCER CELL IMPLANTATION INHIBITORS

(54) 発明の名称: 癌細胞の着床防止剤

(57) Abstract: Cancer cell implantation inhibitors and/or cancer recurrence preventives, for example, preparations and foods or drinks for preventing the implantation and/or metastasis in a recipient of cancer cells contained in a graft and/or transplanted cells. Namely, cancer cell implantation inhibitors, cancer recurrence preventives and foods or drinks for preventing the implantation of cancer cells and/or the recurrence of cancer which contain as the active ingredient a mixture of cyclic and/or chain polylactic acids having a degree of condensation of 3 to 19.

(57) 要約:

本発明の目的は、癌細胞の着床防止剤及び／又は癌再発予防剤、例えば、移植臓器、移植片及び／又は移植細胞に存在する癌細胞のレシビエントにおける着床及び／又は転移を防止するための製剤並びに飲食品を提供することである。本発明によれば、縮合度3～19の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含む、癌細胞の着床防止剤、癌再発予防剤、並びに癌細胞の着床防止及び／又は癌再発予防のための飲食品が提供される。

WO 01/54705 A1

明細書

癌細胞の着床防止剤

技術分野

本発明は、癌細胞の着床防止剤及び／又は癌再発予防剤に関する。より詳細には本発明は、特定の縮合度を有するポリ乳酸混合物を有効成分として含む、癌細胞の着床防止剤及び／又は癌再発予防剤、並びに癌細胞の着床防止及び／又は癌再発予防のための飲食品に関する。

背景技術

悪性腫瘍（癌）が死因の第一位を占める現代においては、癌の予防及び／又は治療に有用な化学療法物質に対する興味と需要が高まっている。癌の化学療法では、抗腫瘍効果とともに、嘔吐、下痢または脱毛、並びに骨髄障害による白血球数減少などの副作用の低減、並びに生存期間の延長などが重要な課題である。

これまでの研究により、縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ L-乳酸混合物は、抗悪性腫瘍剤として（特開平 9-227388 号公報および特開平 10-130153 号公報）、また癌患者の QOL 改善剤として（特願平 11-39894 号明細書；日本癌治療学会誌第 33 巻第 3 号第 493 頁）有用であることが報告されている。

さらに、上記したポリ乳酸混合物が、正常細胞の癌化を抑制または遅延する効果を有すること（環状ポリ乳酸投与によるマウス自然発生癌の発癌抑制効果の検討：日本癌治療学会誌第 33 巻第 3 号第 196 頁、1998）、移植腫瘍細胞を変性させる効果を有すること（担癌マウスにおける環状ポリ乳酸の抗腫瘍効果の検討：Jpn.J.Cancer.Res.88,Suppl.605,1997）、並びに腫瘍細胞を移植した後にポリ乳酸混合物を投与すると腫瘍細胞の転移が抑制されること（ルイス固形癌の増殖及び肺への転移に及ぼす環状ポリ乳酸の効果の検討：日本癌治療学会誌第 33 巻第 3 号第 196 頁、1998）が示唆されている。これまでに確認されている

これらの抗腫瘍作用は、ポリ乳酸混合物が腫瘍細胞の嫌氣的解糖系の抑制に関与することにより発現するものであることが判明している。しかしながら、腫瘍細胞の移植前からポリ乳酸混合物の投与を開始した場合の抗腫瘍作用についてはこれまでに報告されていない。

一方、臓器を個体から取り出して、同一又は異なる個体に移し、その臓器を移した個体内で機能させる臓器移植においては、移植臓器、移植片または移植細胞の中に癌細胞が存在している可能性がある。かかる場合には移植を受けるレシビエントにおける癌の発生及び／又は転移の予防を図る必要がある。移植を受ける患者（レシビエント）に予め薬剤を投与しておくことによって、体外からの移植臓器、移植片または移植細胞に含まれる癌細胞の着床及び転移を防止することができれば、移植の際に極めて有用な薬剤となり得るので、このような薬剤の開発が求められていた。

発明の開示

本発明は、癌細胞の着床防止剤及び／又は癌再発予防剤（例えば、移植臓器、移植片及び／又は移植細胞に存在する癌細胞のレシビエントにおける着床及び／又は転移を防止するための製剤）、並びに癌細胞の着床防止及び／又は癌再発予防のための飲食品を提供することを解決すべき課題とした。

本発明者らは、上記課題を解決することを目的とした検討を行うために、縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を投与したマウスに対して癌細胞を移植し、一定期間後における腫瘍の着床率並びに当該マウスの生存率を調べた。その結果、ポリ乳酸混合物を投与したマウスの方が通常の餌で飼育したマウスよりも移植癌の着床率が低く、癌移植マウスの生存率が向上することが判明した。また、移植した癌細胞の肺転移の程度を調べた結果、癌細胞の移植前からポリ乳酸混合物を投与したマウスの方がポリ乳酸混合物を投与しないマウスよりも、肺転移の程度が低いことも判明した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

即ち、本発明によれば、縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含む、癌細胞の着床防止剤が提供される。

本発明の別の側面によれば、縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含む、癌再発予防剤が提供される。

本発明の製剤は例えば、移植臓器、移植片及び／又は移植細胞に存在する癌細胞のレシビエントにおける着床及び／又は転移を防止するために用いる。

本発明の製剤の投与は、好ましくは、癌の手術または移植に先立って開始される。

好ましくは、ポリ乳酸中における反復単位である乳酸は実質的に L-乳酸から成る。

好ましくは、縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、乳酸を不活性雰囲気下で脱水縮合し、得られた反応液のエタノールおよびメタノール可溶分を逆相カラムクロマトグラフィーに付し、pH 2～3 の 25～50 重量%のアセトニトリル水溶液で溶離後、pH 2～3 の 90 重量%以上のアセトニトリル水溶液で溶離した画分である。

好ましくは、脱水縮合は窒素ガス雰囲気下、段階的減圧及び昇温により行われる。

好ましくは、逆相カラムクロマトグラフィーは、ODS カラムクロマトグラフィーにより行われる。

本発明の別の側面によれば、縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含む、癌細胞の着床防止及び／又は癌再発予防のための飲食品が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、癌細胞の着床防止剤及び／又は癌再発予防剤、並びに癌細胞の着床防止及び／又は癌再発予防のための飲食品の製造における、縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の使用が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、治療及び／又は予防有効量の縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物をヒトを含む哺乳動物に投与する工程

を含む、癌細胞の着床防止及び／又は癌の再発予防のための方法が提供される。

図面の簡単な説明

図 1 は、本明細書の製造例 1 で得られたポリ乳酸混合物の質量スペクトルを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施態様および実施方法について詳細に説明する。

本発明の製剤は縮合度 3 ～ 19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含むものであり、癌細胞の着床防止及び／又は癌の再発予防、より具体的には、例えば、癌の手術後の再発予防、あるいは移植臓器、移植片及び／又は移植細胞に存在する癌細胞のレシビエントにおける着床及び／又は転移を防止するために用いられる。

本発明者らは今回、縮合度 3 ～ 19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物をマウスに投与することにより、体外から移植された腫瘍細胞の着床（定着）を抑制することができ、担癌マウスの生存率を向上させることができることを見出した。これらの現象は、ポリ乳酸混合物が嫌氣的解糖系の抑制に関与するという従来の知見からは予測することができない新たな知見である。本発明は以下の理論に拘束されることはないが、ポリ乳酸混合物は生体の免疫機構の調節にも関与していることが推測される。

本明細書で言う「着床」とは、癌細胞がある部位で自律的に増殖していくことを意味し、例えば、患者に存在していた癌細胞が他の部位に転移してそこで自律的に増殖していくこと、あるいは移植細胞、移植片または移植臓器に存在する癌が移植した部位において自律的に増殖していく場合などが挙げられる。本発明の製剤は、このような癌細胞の着床防止のために使用することができる。本発明の製剤は癌の再発予防のために使用することもできる。癌の再発とは手術等で癌を一旦切除した後、一定期間経過後に別の部位で癌が着床／増殖していくことを言

う。癌の再発は、例えば、手術の際における癌の取り残し等が原因となり、残存した癌が別の部位に転移することによって生じる。本発明の製剤を好ましくは手術に先立って投与することによって、癌の再発を予防することができる。

本明細書で言う「移植」とは、細胞、組織または臓器が同一個体内（自家移植）、異なる個体間（同系、同種移植）、または異なる種属の個体間（異種移植）で注入または移入されることを意味し、単に「移植」という場合には、自家移植、同系／同種移植、並びに異種移植の全てを含む。細胞移植としては、輸血や骨髄移植などが挙げられ、組織移植としては、角膜移植、骨移植、皮膚移植、血管移植、心臓弁移植、上皮小体移植などが挙げられ、臓器移植としては、腎移植、肝移植、脾移植、肺移植、心移植、心肺同時移植などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

本明細書で言う「転移」とは、癌が転移すること、例えば、移植細胞、移植片または移植臓器に存在する癌が他の箇所に転移することを意味する。より詳細には、移植細胞、移植片または移植臓器から腫瘍細胞が分離して遠隔部位（遠隔臓器等）へ運ばれ、そこで自律性に増殖することである。転移は主として、リンパ行性転移、血行性転移、接触性転移及び播種性転移の4通りの経路により生じるが、本発明ではこれらに限定されるものではない。

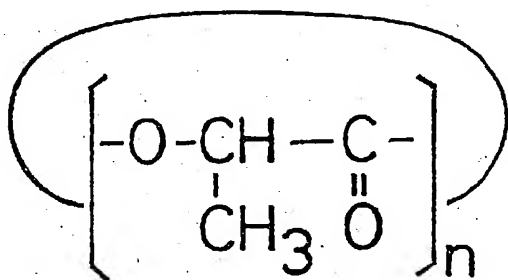
本明細書で用いる「癌」とは、悪性腫瘍の全てを包含する最も広い意味を有し、癌腫（上皮性の悪性腫瘍）、肉腫（非上皮性の悪性腫瘍）、並びにこれらの混合型の全てを包含する。移植癌の種類はその発生部位によっても分類することもでき、例えば、下垂体腺腫、神経膠腫、聴神経鞘腫、脳腫瘍、咽頭癌、喉頭癌、胸腺腫、中皮腫、乳癌、肺癌、胃癌、食道癌、大腸癌、肝細胞癌、脾癌、脾内分泌腫瘍、胆管癌、胆嚢癌、陰茎癌、尿管癌、腎細胞癌、精巣（睾丸）腫瘍、前立腺癌、膀胱癌、外陰癌、子宮癌、子宮肉腫、陰癌、乳癌、卵巣癌、卵巣胚細胞腫瘍、悪性黒色腫、菌状息肉症、皮膚癌、軟部肉腫、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、形質細胞性腫瘍、褐色リンパ腫および脾内分泌腫瘍などが挙げられるが、上記具体例は癌の具体例を例示したものにとすぎず、

これらに限定されるわけではない。

本発明の製剤においては、縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が有効成分として用いられる。

本明細書で言う「ポリ乳酸混合物」とは、縮合度 3～19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸が任意の割合で存在する混合物を意味する。即ち、「混合物」という用語は、縮合度 3～19 の何れかを有するポリ乳酸の混合物であることを意味すると同時に、環状および鎖状のポリ乳酸の混合物を含む概念としても用いられる。このような「ポリ乳酸混合物」は、本明細書中以下に述べるように、乳酸を脱水縮合し、適当な方法で精製することにより得ることができる。なお、本明細書では便宜上「ポリ乳酸混合物」という用語を用いたが、この中には一定の縮合度を有する環状のポリ乳酸または一定の縮合度を有する鎖状のポリ乳酸といった単一成分から成るポリ乳酸も含まれる。

縮合度とは、ポリ乳酸中における反復単位である乳酸単位の数进行意味する。例えば、環状のポリ乳酸は下記の構造式を有することが推測されるが、式中の n が縮合度を表す（即ち、 $n = 3 \sim 19$ ）。



本明細書で単に「乳酸」と称する場合、この乳酸には L-乳酸、D-乳酸またはこれらの任意の割合の混合物の全てが包含される。本発明においては好ましくは、乳酸は実質的に L-乳酸から成る。ここで言う「実質的に」とは、ポリ乳酸混合物中における L-乳酸単位の比率〔即ち、 $(\text{L-乳酸単位数} / \text{L-乳酸単位数} + \text{D-乳酸単位数}) \times 100$ 〕が、例えば 70% 以上、好ましくは 80% 以上、

より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上であることを意味する。なお、ポリ乳酸混合物中におけるL-乳酸単位の比率は、出発物質として使用する乳酸中に存在するL-乳酸とD-乳酸の比率に依存する。

縮合度3～19の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の製造方法は、特に限定されるものではないが、例えば、特開平9-227388号公報、特開平10-130153号公報、または特願平11-39894号明細書（これらの特許明細書に記載の内容は全て引用により本明細書の開示として含める。）などに記載の製造方法により得ることができる。

より具体的には、例えば、縮合度3～19の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、下記の方法Aにより得ることができる。

方法A：

まず、乳酸（好ましくは、実質的にL-乳酸から成る乳酸）を不活性雰囲気下で脱水縮合させる。不活性雰囲気としては、例えば、窒素ガス、アルゴンガスなどが挙げられるが、窒素ガスを用いるのが好ましい。

脱水縮合反応は、常圧～1 mmHg程度の減圧下、110～210℃、好ましくは130～190℃の温度で行われるが、段階的減圧および段階的昇温によって行うのが特に好ましい。反応時間は適宜設定できるが、例えば1～20時間反応を行うことができる。段階的減圧および段階的昇温を用いる場合には、反応時間を2以上から成る部分的な反応時間に分け、それぞれの部分において圧力と温度を設定して反応を行う。段階的減圧を用いる場合は、例えば、常圧→150 mmHg→3 mmHgと減圧することができ、段階的昇温を用いる場合は、例えば、145℃→155℃→185℃と昇温することができる。実際には、これらを組み合わせて、例えば、145℃で常圧で3時間、145℃で150 mmHgで3時間、155℃で3 mmHgで3時間そして185℃で3 mmHgで1.5時間反応を行うことができる。

次いで、この脱水縮合反応により得られた反応混合物にエタノールおよびメタノールを加え、濾過して濾液を乾燥してエタノールおよびメタノール可溶分が得られる。即ち、本明細書で言う「エタノールおよびメタノール可溶分」とはエタノールとメタノールの混合液に可溶な画分を意味する。なお、エタノールおよびメタノール可溶分を得る際には、脱水縮合反応の反応混合物をエタノールおよびメタノールと混合するが、その際のエタノールとメタノールの比率は適宜設定することができ、例えばエタノール：メタノール＝１：９である。なお、反応混合物にエタノールとメタノールを添加する順番、方法などは限定されず、適宜選択することができ、例えば、脱水縮合反応の反応混合物に先ずエタノールを添加し、次いでメタノールを添加することができる。

上記で得られたエタノール・メタノール可溶分を逆相カラムクロマトグラフィー、特にオクタデシルシラン（ODS）カラムを用いたクロマトグラフィーに付し、まずpH 2～3の25～50重量%のアセトニトリル水溶液で溶離する画分を除去し、次いでpH 2～3の90重量%以上のアセトニトリル水溶液、好ましくは99重量%以上のアセトニトリル水溶液で溶離してくる画分を採取すると、縮合度3～19の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が得られる。

上記のようにして得られた環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、水酸化ナトリウムなどのアルカリ物質で中和し、減圧乾燥後、常法により下記に述べるような所望の形態に製剤化することができる。

本発明で用いる縮合度3～19の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を製造するための別法としては、例えば、特願平11-265715号明細書に記載された方法（方法Bとする）または特願平11-265732号明細書に記載された方法（方法Cとする）を挙げることができる（これらの特許明細書に記載の内容は全て引用により本明細書の開示として含める。）。以下、方法Bおよび方法Cについて具体的に説明する。

方法B：

この方法は、ラクチドを $RYLi$ （式中、 R は脂肪族基又は芳香族基を示し、 Y は酸素原子又はイオウ原子を示す）で表されるリチウム化合物の存在下で重合させることによって環状乳酸オリゴマーを製造する方法である。重合反応を実施する場合、リチウム化合物（ $RYLi$ ）の使用割合は、ラクチド1モル当たり、 $1 \sim 0.1$ モル、好ましくは $0.2 \sim 0.3$ モルの割合である。反応温度は $-100 \sim 0^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは $-78 \sim -50^{\circ}\text{C}$ である。反応は、 $-78 \sim -50^{\circ}\text{C}$ の温度で開始し、徐々に室温にまで昇温させるように実施するのが好ましい。反応は、好ましくは反応溶媒の存在下で実施される。反応溶媒としては、テトラヒドロフラン等の環状エーテルの他、ジエチルエーテル、ジメトキシエタン等を用いることができる。反応雰囲気としては、窒素ガスやアルゴン等の不活性ガス雰囲気が用いられる。反応圧力は特に制約されず、好ましくは常圧である。

なお、上記のようにして得られる乳酸オリゴマーの組成（即ち、環状乳酸オリゴマーと鎖状乳酸オリゴマーの混合比率）は、反応助剤として用いるリチウム化合物によって変動する。リチウム化合物として炭素数 $1 \sim 3$ のアルキルアルコールのリチウム化合物（ $ROLi$ ）（式中、 R は炭素数 $1 \sim 3$ のアルキル基）を用いる場合には、環状乳酸オリゴマーと鎖状オリゴマーとの混合物（環状乳酸オリゴマーの割合： $80 \sim 85$ 重量%）が得られる。一方、リチウム化合物としてトールアルアルコール等の炭素数4以上のアルキルアルコールのリチウム化合物や、チオフェノール化合物を用いるときには、実質的に環状乳酸オリゴマーのみを選択的に得ることができる。

方法C：

この方法は、(i) 乳酸を $350 \sim 400 \text{ mmHg}$ の圧力条件で $120 \sim 140^{\circ}\text{C}$ の範囲の温度に加熱し、脱水縮合反応させるとともに、ラクチドを留出させずに副生水のみを留出除去する第1加熱工程、

(ii) 該第1加熱工程終了後、反応生成物を $150 \sim 160^{\circ}\text{C}$ の温度に加熱し、該反応圧力を降圧速度 $0.5 \sim 1 \text{ mmHg/分}$ で $15 \sim 20 \text{ mmHg}$ まで降下さ

せるとともに、その降圧に際し、ラクチドの留出を回避させながら副生水のみを留出除去し、該反応圧力が15～20 mmHgに降下後、同圧力条件及び反応温度150～160℃においてさらに反応を継続して鎖状乳酸オリゴマーを主成分とする脱水縮合物を生成させる第2加熱工程、

(iii) 該第2加熱工程終了後、0.1～3 mmHgの圧力条件で150～160℃で加熱して該鎖状乳酸オリゴマーを環化させ、環状オリゴマーを生成させる第3加熱工程、

からなることを特徴とする方法である。

この方法ではまず、第1加熱工程において、減圧下において乳酸を加熱し、脱水縮合反応させる。この場合の反応時間は3～12時間、好ましくは5～6時間である。この第1加熱下での反応は、その反応を円滑に進行させるために、乳酸の脱水縮合により生成する副生水を留去させるが、この場合、乳酸2分子の脱水縮合物であるラクチドが留去しないように実施する。このためには、反応圧力を減圧、好ましくは300～500 mmHg、より好ましくは350～400 mmHgに保持し、この圧力条件下において、100～140℃、好ましくは130～140℃の範囲に加熱するのがよい。この第1加熱工程での反応により、主に、乳酸の3～23分子の脱水縮合物を主成分とする反応生成物が生じる。

上記第1加熱工程の終了後、第2加熱工程において、高められた平均重合度のオリゴマーが得られるように、前記第1加熱工程における反応温度よりも高められた温度、好ましくは145～180℃、より好ましくは150～160℃の温度に加熱するとともに、反応圧力を10～50 mmHg、好ましくは15～20 mmHgの圧力に降下させてさらに脱水縮合反応を継続する。

この反応も、前記第1加熱工程の反応の場合と同様に、反応を円滑に進行させるために副生水を留去させるが、ラクチドが留去しない条件で実施する。反応圧力を前記範囲の圧力にまで降下させる速度（降圧速度）は、ラクチドの留出を回避し、且つ反応効率を高めるためには、0.25～5 mmHg/分、好ましくは0.5～1 mmHg/分の範囲に保持することが通常は必要である。前記範囲よ

り低い降圧速度では、その所定圧まで降圧させるのに必要な時間が長くなるため好ましくなく、一方、前記範囲より高い降圧速度では、ラクチドが副生水とともに留去するようになるので好ましくない。

反応圧力が所定圧力にまで降下後、この反応圧力において、さらに反応を継続する。この場合の加熱時間は、3～12時間、好ましくは5～6時間である。

前記第2加熱工程での反応により、平均重合度が3～30、好ましくは3～23の乳酸オリゴマーが得られるが、この場合のオリゴマー中の環状オリゴマーの割合は、通常、70～80wt%程度である。

上記第2加熱工程終了後、第3加熱工程において、反応圧力を0.25～5mmHg、好ましくは0.5～1mmHgに保持し、145～180℃、好ましくは150～160℃の温度でさらに反応を継続する。反応時間は3～12時間、好ましくは5～6時間である。この場合に生じる副生水も留去させる。この場合、ラクチドの留去も回避させることが好ましいが、反応生成物にはラクチドは殆んど含まれないので、その降圧速度を格別遅くする必要はない。

前記第3加熱工程での反応により、平均重合度3～30、好ましくは3～23で、かつ環状オリゴマーの割合が90重量%以上、好ましくは99重量%以上の乳酸オリゴマーが生成される。

なお、上記方法A、BおよびCは本発明で用いるポリ乳酸混合物の製造方法の具体例の一部を示したものにすぎず、本発明においては他の方法で製造されたポリ乳酸混合物を用いることもできる。

本発明の製剤の形態は特に限定されず、経口投与又は非経口投与用の製剤形態の中から治療や予防の目的に最も適した適宜の形態のものを選択することが可能である。経口投与に適した製剤形態としては、例えば、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、シロップ剤、溶液剤、乳剤、懸濁剤、チュアブル剤などを挙げることができ、非経口投与に適する製剤形態としては、例えば、注射剤（皮下注射、筋肉内注射、又は静脈内注射など）、点滴剤、吸入剤、噴霧剤、坐剤、ゲル剤若しくは軟膏剤などの形態の経皮吸収剤、経粘膜吸収剤、貼付剤若しくはテープ

剤などの形態の経皮吸収剤などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

経口投与に適当な液体製剤、例えば、溶液剤、乳剤、又はシロップ剤などは、水、ショ糖、ソルビット、果糖などの糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油、大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミントなどのフレーバー類などを用いて製造することができる。また、カプセル剤、錠剤、散剤、又は顆粒剤などの固体製剤の製造には、乳糖、ブドウ糖、蔗糖、マンニットなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの滑沢剤、ポリビニールアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いることができる。

非経口投与に適当な注射用又は点滴用の製剤は、好ましくは、受容者の血液と等張な滅菌水性媒体に有効成分である上記の物質を溶解又は懸濁状態で含んでいる。例えば、注射剤の場合、塩溶液、ブドウ糖溶液、又は塩水とブドウ糖溶液との混合物からなる水性媒体などを用いて溶液を調製することができる。腸内投与のための製剤は、例えば、カガオ脂、水素化脂肪、又は水素化カルボン酸などの担体を用いて調製することができ、座剤として提供される。また、噴霧剤の製造には、有効成分である上記の物質を微細な粒子として分散させることができ、受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ有効成分の吸収を容易ならしめる担体を用いることができる。担体としては、具体的には、乳糖又はグリセリンなどが例示される。有効成分である物質及び使用する担体の性質に応じて、エアロゾル又はドライパウダーなどの形態の製剤が調製可能である。これらの非経口投与用製剤には、グリコール類、油類、フレーバー類、防腐剤、賦形剤、崩壊剤、滑沢剤、結合剤、界面活性剤、可塑剤などから選択される1種又は2種以上の補助成分を添加することもできる。

本発明の製剤の投与量及び投与回数は、疾患の種類や重篤度、投与形態、患者

の年齢や体重などの条件、合併症の有無などの種々の要因により適宜設定することができるが、一般的には、有効成分の投与量として一日当り20～2000mg/kg、好ましくは20～200mg/kg、より好ましくは50～150mg/kgである。上記投与量の製剤を一日1～4回程度、好ましくは2～4回程度に分けて投与することが好ましい。

本発明の製剤は、ヒトを含む任意の哺乳動物に投与することができるが、好ましくはヒトに投与される。

本発明の製剤の投与時期は特に限定されず、癌の手術の前後または移植の前後を含む任意の時期に投与することができるが、癌の手術または移植に先立って投与を開始することが好ましい。特に、本発明の製剤を手術後における癌再発の予防剤として使用する場合には、手術に先立って投与することにより本発明の効果をより発揮することができる。同様に本発明の製剤を移植臓器、移植片及び／又は移植細胞に存在する癌細胞のレシビエントにおける着床及び／又は転移を防止するために使用する場合には、移植に先立って投与を開始することにより本発明の効果をより発揮することができる。

本発明で用いる縮合度3～19の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物は、癌細胞の着床防止剤及び／又は癌再発予防剤として使用するのみならず、栄養ドリンク剤などのドリンク剤に配合したり、食品添加物として健康食品などの食品類に配合することもできる。縮合度3～19の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を含む本発明による飲食品の製品の具体例としては、清涼飲料、ドリンク剤、健康食品、特定保健用食品、機能性食品、機能活性型食品、栄養補助食品、サプリメント、飼料、飼料添加物などと一般に呼称される、飲料を含む健康食品または補助食品が挙げられる。

ポリ乳酸混合物を配合できる飲食品の具体例としては、例えば、チューインガム、チョコレート、キャンディー、錠菓、ゼリー、クッキー、ビスケット、ヨーグルト等の菓子類、アイスクリーム、氷菓等の冷菓類、茶、清涼飲料（ジュース、コーヒー、ココア等を含む）、栄養ドリンク剤、美容ドリンク剤等の飲料、パン、

ハム、スープ、ジャム、スパゲティー、冷凍食品など全ての飲食物を挙げることができる。あるいは、本発明で用いるポリ乳酸混合物は調味料、食品添加剤などに添加して用いることもできる。

本発明の上記飲食品を用いることにより、癌細胞の着床防止及び／又は癌再発予防効果を発揮でき、実質的に有害な副作用を示さない安全な飲食品を提供することができる。

本発明の飲食品は、健康食品または補助食品などのあらゆる形態の飲食品を包含するものであり、その種類は特に制限されず、上記したような各種飲食物、あるいは各種栄養組成物、例えば各種の経口又は経腸栄養剤や飲料等に、縮合度3～19の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を配合して飲食品として提供することができる。このような飲食品の組成としては、縮合度3～19の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物の他に、蛋白質、脂質、糖質、ビタミン及び／又はミネラル類などを含めることができる。飲食品の形態は特に限定されず、摂取しやすい形態であれば、固形、粉末、液体、ゲル状、スラリー状等のいずれであってもよい。

飲食品中におけるポリ乳酸混合物の含有量は特には限定されないが、一般的には0.1～20重量%、より好ましくは0.1～10重量%程度である。

飲食品に含まれるポリ乳酸混合物の量は、本発明の目的を発揮できる程度に含まれることが好ましく、好ましくは摂取される飲食物1食中に0.1gから10g程度、より好ましくは0.5gから3g程度である。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によっていかなる点においても限定されることはない。

実施例

製造例1：ポリ乳酸混合物の製造

マントルヒーターに収めたセパラブルフラスコにL-乳酸（D-乳酸も混入しているもの）500mlを入れた。窒素ガス300ml／分の流入及び攪拌を行

い、溜出水は保温した下降型接続管を経て還流冷却器付フラスコに導きながら、
145℃で3時間加熱した。更に150 mmHgに減圧して同温度で3時間加熱
した後、3 mmHgの減圧下155℃で3時間、最後に3 mmHgの減圧下18
5℃で1.5時間加熱し、反応生成物であるポリ乳酸を得た。

得られたポリ乳酸は100℃に保ち、エタノール100 mlに続いてメタノー
ル400 mlをそれぞれ加えた後放冷した。これをメタノール500 ml中に加
え、よく攪拌して静置した後濾過して精製した。その濾液を減圧乾燥してアセト
ニトリルに溶解し、全量を200 ml (原液) とした。

この原液を、予め平衡化した逆相ODSカラム (TSK gel ODS-80TM)
にかけ、0.01 M塩酸を含む30%、50%および100%アセトニトリル (p
H 2.0) でステップワイズに溶離し、アセトニトリル100%溶出画分である
ポリ乳酸 (縮合度3~19) を得た。得られた物質の質量スペクトルを図1に示
す。図1中の規則的なフラグメントイオンピークから明らかなように、得られた
ポリ乳酸の混合物は、環状縮合体を主体とし、直鎖状縮合体が少量混在した状態
になっている。

試験例1:

4週齢のマウスに10 g/kg (1重量%) の割合でポリ乳酸混合物 (製造例
1で調製したもの) を混合した餌、あるいはポリ乳酸混合物を含有しない通常の
餌を与え、1ヶ月間飼育した後、大腿部筋肉内にLewis肺がん細胞 (1000個
/マウス) を移植した。マウスは通常の餌を与えた個体群 (コントロール群: 1
1匹) とポリ乳酸混合物含有餌を与えた個体群 (CPL群: 11匹) に分けた。

Lewis肺がん細胞 (1000個/マウス) の移植後、さらに飼育を続けた結果、
コントロール群では11匹中8匹が発癌し (腫瘍着床率: 72.3%)、発癌した8
匹の個体中の5匹は癌移植後30日以内に死亡した。一方、CPL群では11匹
中4匹が発癌し (腫瘍着床率: 36.4%)、発癌した4匹の個体中で30日以
内に死亡した個体は1個体であった。

また、移植後30日目におけるコントロール群及びCPL群の発癌個体（生存している個体として各群3個体）の腫瘍体積の平均は、4850.9立方ミリメートル（コントロール群）と4991.0立方ミリメートル（CPL群）であった。CPL群の中の1個体の腫瘍体積は、他の個体よりも明らかに少なかった（1224.6立方ミリメートル）。

また、上記結果の通り、CPL投与により移植癌細胞の着床率はほぼ半減したが、発癌した場合には腫瘍体積には大きな差は認められなかった。これらの結果から、移植前1カ月間の前投与は、この条件では腫瘍の増殖抑制には殆ど効果を示さないが、着床防止には明らかに有効であることが分かる。

癌移植後30日目に発癌個体（各群3個体）を解剖し、肺転移について肺表面の癌コロニーの大きさを以下の5段階に分類して評価し、コロニー数を計測した。得られた結果を表1に示す。

5+：肺葉全体に広範囲に広がったコロニー

4+：2～3mmを超えるコロニー

3+：1mm程度のコロニー

2+：1mm以下のコロニー

1+：微小なコロニー

表1

	5+	4+	3+	2+	1+
コントロール群	2	10	16	18	36
CPL群	1	3	1	4	20

ただし、CPL群の5+と評価されたコロニーは、肺全体のほぼ80%に広がった巨大ながん組織であった。また、CPL群の1個体を除く他の個体では、腹大動脈周囲リンパ節、縦隔リンパ節に癌転移が認められた。

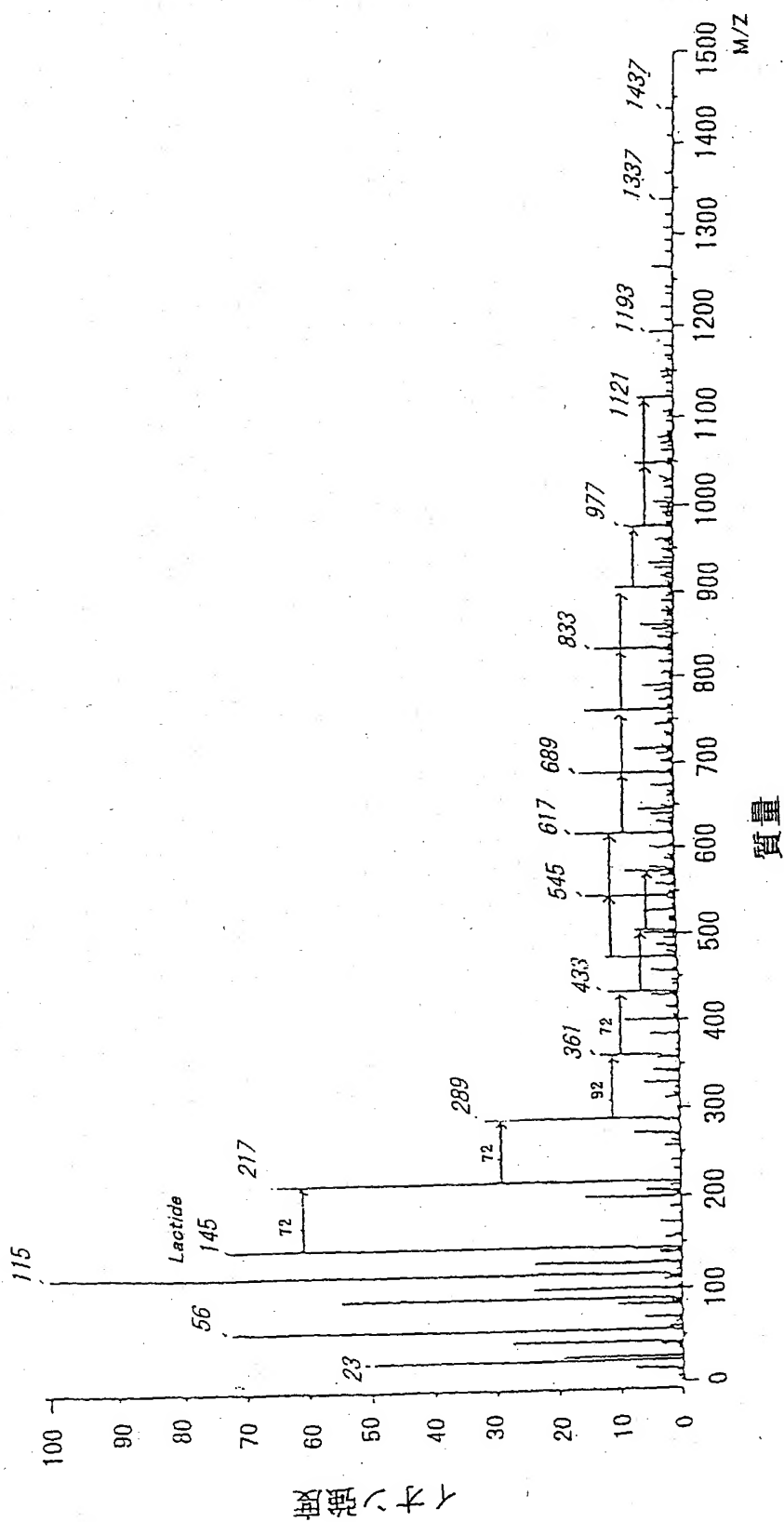
産業上の利用の可能性

本発明の製剤及び飲食品は、癌細胞の着床防止及び／又は癌再発予防のために有用であり、例えば、癌手術後における再発予防剤、移植臓器、移植片及び／又は移植細胞に存在する癌細胞のレシピエントにおける着床及び／又は転移を防止するために使用することができる。また、本発明において有効成分として用いられるポリ乳酸混合物は、生体成分に由来する乳酸の低縮合体であることから、生体適合性が高く、副作用が少ない。

請求の範囲

1. 縮合度 3 ～ 19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含む、癌細胞の着床防止剤。
2. 縮合度 3 ～ 19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含む、癌再発予防剤。
3. 移植臓器、移植片及び／又は移植細胞に存在する癌細胞のレシピエントにおける着床及び／又は転移を防止するために用いる請求項 1 または 2 に記載の製剤。
4. 癌の手術に先立って投与を開始する、請求項 1 又は 2 に記載の製剤。
5. 移植に先立って投与を開始する、請求項 3 に記載の製剤。
6. ポリ乳酸中における反復単位である乳酸が実質的に L-乳酸から成る、請求項 1 から 5 の何れか 1 項に記載の製剤。
7. 縮合度 3 ～ 19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物が、乳酸を不活性雰囲気下で脱水縮合し、得られた反応液のエタノールおよびメタノール可溶分を逆相カラムクロマトグラフィーに付し、pH 2 ～ 3 の 25 ～ 50 重量%のアセトニトリル水溶液で溶離後、pH 2 ～ 3 の 90 重量%以上のアセトニトリル水溶液で溶離した画分である、請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の製剤。
8. 脱水縮合を窒素ガス雰囲気下、段階的減圧及び昇温により行う、請求項 7 に記載の製剤。
9. 逆相カラムクロマトグラフィーを、ODSカラムクロマトグラフィーにより行う請求項 7 又は 8 に記載の製剤。
10. 縮合度 3 ～ 19 の環状及び／又は鎖状のポリ乳酸混合物を有効成分として含む、癌細胞の着床防止及び／又は癌再発予防のための飲食品。

第1図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00482

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K31/765, A61P35/04, A23L1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K31/765, A61P35/04, A23L1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLIN (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 10-130153, A (Shumeido K.K.), 19 May, 1998 (19.05.98), abstract; Claims; Par. No. [0038] (Family: none)	1-10
X	JP, 9-227388, A (Tetsuaki Naganushi), 02 September, 1997 (02.09.97), abstract; Claims; Par. No. [0039] (Family: none)	1-10
X	JP, 7-233061, A (Global Art K.K.), 05 September, 1995 (05.09.95), abstract; Claims; Par. Nos. [0015], [0018] (Family: none)	1-10
X	JP, 6-336427, A (Global Art K.K.), 06 December, 1994 (06.12.94), abstract; Claims; Par. No. [0040] (Family: none)	1-10
X	JP, 5-310581, A (Koken K.K.), 22 November, 1993 (22.11.93), abstract; Claims; Par. No. [0040] (Family: none)	
	Yasukazu Nagato, et al., "Kengiteki Kaitoukei Yokusei	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 April, 2001 (10.04.01)Date of mailing of the international search report
24 April, 2001 (24.04.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00482

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Busshitsu ; CPL no Kou Shuyou Sayou -(1 st ed.) Keikou Touyo no yoru Mouse Hatsugan Yokusei no Kentou", Wakani Yakugaku Zasshi, 1998, Vol.15, No.5, pp.338-339, esp., page 338, left column, line 15 to right column, line 6	1-6
X	Shigeo Takada, et al., "Lewis Kokei Gan no Zoushoku oyobi Hai e no Teni ni oyobosu Kanjo Polylactate no Kouka no Kentou", Nippon Gan Chiryo Gakkaishi, 1998, Vol. 33, No., pages 196 (222), GP257	1-6
X	Yasukazu Nagato, et al., "CPL Touyo ni yoru Mouse Shizen Hasei Gan no Hatsugan Kouka no Kentou", Nippon Gan Chiryo Gakkaishi, 1998, Vol. 33, No. 3, pages 196(222), GP258	1-6
X	Youichiro Naganushi, et al., "Usagi Kanzou ni Ishoku shita VX2 Gan ni taisuru CPL no Kouka", Igaku to Seibutsugaku, 1997, Vol. 135, No. 5, pages 235-239, Full text	1-6
X	TAKADA, Shigeo et al, "EFFECT OF CYCLIC POLYLACTATE ON TUMOR CELLS AND TUMOR BEARING MICE.", BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, 1997, Vol.43, No.1, pages 9-17, Full text	1-6
X	Shigeo Takada, et al., "Bauyou Hito Gansaibou ni oyobosu Kanjou Polylactate no Kouka", Igaku to Seibutsugaku, 1997, Vo. 135, No. 3, pages 89-92, Full text	1-6
X	Youichiro Naganushi et al., "Tan Gan Doubutsu (Yoshida Nikushu Isholu Rat) ni taisuru CPL Joumyaku Touyo no Kouka", Igaku to Seibutsugaku, 1997, Vol.135, No.1, pages 33-36, Full text	1-6

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/00482

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/765, A61P35/04, A23L1/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/765, A61P35/04, A23L1/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLIN (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 10-130153, A (株式会社主命堂) 19. 5月. 1998 (19. 05. 98) 【要約】、【特許請求の範囲】、 【0038】 ファミリーなし	1-10
X	JP, 9-227388, A (長主 哲明) 02. 9月. 1997 (02. 09. 97) 【要約】、【特許請求の範囲】、 【0039】 ファミリーなし	1-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 04. 01

国際調査報告の発送日

24. 04. 01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

浅賀 下

浩

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	J P, 7-233061, A (グローバルアート株式会社) 05. 9月. 1995 (05. 09. 95) 【要約】、 【特許請求の範囲】、【0015】、【0018】 ファミリーなし	1-10
X	J P, 6-336427, A (グローバルアート株式会社) 06. 12月. 1994 (06. 12. 94) 【要約】、 【特許請求の範囲】、【0040】 ファミリーなし	1-10
X	J P, 5-310581, A (興研株式会社) 22. 11月. 1993 (22. 11. 93) 【要約】、 【特許請求の範囲】、【0040】 ファミリーなし	
X	長戸 康和 等、「嫌氣的解糖系抑制物質、環状ポリ乳酸 (CPL) の抗腫瘍作用ー (第1報) 経口投与によるマウス発癌抑制の検討」、和漢医薬学雑誌、1998年、第15巻、第5号、第338-339ページ、特に、第338ページ左欄第15行-右欄第6行	1-6
X	高田 繁生 等、「ルイス固形癌の増殖及び肺への転移に及ぼす環状ポリ乳酸の効果の検討」、日本癌治療学会誌、1998年、第33巻、第3号、196(222)ページ、GP257	1-6
X	長戸 康和 等、「環状ポリ乳酸 (CPL) 投与によるマウス自然発生癌の発癌効果の検討」、日本癌治療学会誌、1998年、第33巻、第3号、196(222)ページ、GP258	1-6
X	長主 陽一朗 等、「ウサギ肝臓に移植したVX2癌に対する環状ポリ乳酸 (CPL) の効果」、医学と生物学、1997年、第135巻、第5号、第235-239ページ、文献全体	1-6
X	TAKADA, Shigeo et al, "EFFECT OF CYCLIC POLYLACTATE ON TUMOR CELLS AND TUMOR BEARING MICE.", BIOCHEMISTRY and MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, 1997, Vol. 43, No. 1, pp. 9-17, 文献全体	1-6
X	高田 繁生 等、「培養ヒト癌細胞に及ぼす環状ポリ乳酸の効果」、医学と生物学、1997年、第135巻、第3号、第89-92ページ、文献全体	1-6
X	長主 陽一朗 等、「担癌動物 (吉田肉腫移植ラット) に対する環状ポリ乳酸 (CPL) 静脈投与の効果」、医学と生物学、1997年、第135巻、第1号、第33-36ページ、文献全体	1-6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	長戸 康和 等、「環状ポリ乳酸 (CPL) のマウス腹水腫瘍細胞 (FM3A 細胞) に対する効果」、医学と生物学、1997年、第134巻、第2号、第45-48ページ、文献全体	1-6
X	長戸 康和 等、「環状ポリ乳酸 (CPL) による移植腫瘍細胞の形態変化」、医学と生物学、1997年、第134巻、第4号、第135-139ページ、文献全体	1-6
PA	JP, 2000-72680, A (株式会社主命堂) 07. 3月. 2000 (07. 03. 00) ファミリーなし	1-10
PA	JP, 2000-239171, A (東海教育産業株式会社) 05. 9月. 2000 (05. 09. 00)	1-10